



1636 #2
Dd
3/29/01

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Shih-Chieh Hung et al. Art Unit : Unknown
Serial No. : 09/761,893 Examiner : Unknown
Filed : January 17, 2001
Title : METHOD OF ISOLATING MESSENCYMAL STEM CELLS

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC § 119

Applicants hereby confirm their claim of priority under 35 USC § 119 from Taiwan
Application No. 089121676 filed October 17, 2000.

A certified copy of the application from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date: 3-14-02

Y. Rocky Tsao
Y. Rocky Tsao
Reg. No. 34,053

Fish & Richardson P.C.
225 Franklin Street
Boston, MA 02110-2804
Telephone: (617) 542-5070
Facsimile: (617) 542-8906

20194830.doc

CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Date of Deposit

Signature

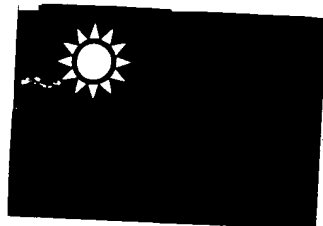
Typed or Printed Name of Person Signing Certificate

March 14, 2001

Diane M. Saturno

Diane M. Saturno

RECEIVED
MAR 2 2001
TECH CENTER 1000



中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

RECEIVED
MAR 21 2001
TECHNICAL CENTER 1600/1600

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this
office of the application as originally filed which is identified hereunder

申請日：西元 2000 年 10 月 17 日
Application Date

申請案號：089121676
Application No.

申請人：台北榮民總醫院
Applicant(s)

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

局長
Director General

陳明邦

發文日期：西元 2001 年 2 月
Issue Date

發文字號：
Serial No. 09011001535

申請日期：	案號：
類別：	

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中 文	新穎之分離間質幹細胞的方法
	英 文	
二、 發明人	姓 名 (中文)	1. 洪士杰 2. 羅惠熙
	姓 名 (英文)	1. 2.
	國 籍	1. 中華民國 2. 中華民國
	住、居所	1. 台北市富貴一路1巷12號1樓 2. 台北市石牌路二段201之179號
三、 申請人	姓 名 (名稱) (中文)	1. 台北榮民總醫院
	姓 名 (名稱) (英文)	1.
	國 籍	1. 中華民國
	住、居所 (事務所)	1. 台北市石牌路二段201號
	代表人 姓 名 (中文)	1. 張茂松
	代表人 姓 名 (英文)	1.

四、中文發明摘要 (發明之名稱：新穎之分離間質幹細胞的方法)

本發明揭示一種新穎之分離純化間質幹細胞的方法，其特徵在於利用細胞之物理及生物學的特性，在不使用抗體的情況下，分離並純化具有多分化特性之間質幹細胞；本發明也有關於所分離的間質幹細胞之應用，當組織因老化、外傷或疾病損壞時，此間質幹細胞可作為細胞置換及基因治療之用途。

英文發明摘要 (發明之名稱：)



本案已向

國(地區)申請專利

申請日期

案號

主張優先權

無

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

無

五、發明說明 (1)

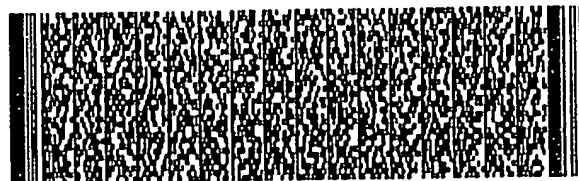
發明領域

本發明係有關於一種新穎之分離間質 (mesenchymal) 幹細胞的方法，特別是有關於根據物理及生物學的特性，利用一培養裝置而分離純化間質幹細胞。

發明背景

隨著細胞培養及分子生物學的進展，研究人員已快速地發展出新的組織工程技術 (Langer R, Vacanti JP, Tissue Engineering, Science 260:920-926, 1993)，以及在疾病治療上的應用 (Langer R, Vacanti JP, Artificial Organs, Scientific American 273(3):130-133, 1995)。有三種主要的成份是牽涉到組織工程在將來臨床的應用，包括：(1) 細胞及幹細胞 (stem cells)；(2) 生物材料為基底的支架 (scaffolds)；以及 (3) 生物活性因子，例如，細胞激素或生長因子。幹細胞是在胚胎、胎兒及成人組織中所發現的細胞族群，其可具有自我修補的能力，以及回復成為數種 (multi-) 分化、多 (pluri-) 分化或全 (toti-) 分化的功能。

由於考量到倫理的問題，使用胚胎或胎兒衍生的幹細胞所進行的基礎或臨床研究，在許多國家是受到限制或禁止的。特別地，當植入裸鼠時，胚胎幹細胞便開始分化成各種的組織，包括皮膚、肌肉、骨骼、軟骨以及一些不可預期的成份。例如，當僅需要肌肉組織時，有時會誘導出不需要的皮膚、骨骼或軟骨。反之，成人衍生的幹細胞較

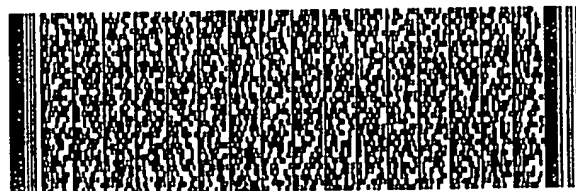


五、發明說明 (2)

容易控制分化成為預期的組織，並且被視為對將來具有較大潛力的應用價值。

成人衍生的幹細胞包括神經幹細胞 (NSCs)、造血幹細胞 (HSCs) 以及間質幹細胞 (MSCs)。間質幹細胞是存在於骨髓、血液、真皮及骨膜中，原生性具有多分化功能之胚細胞。它們可不分化而一直增殖，並可根據不同的細胞激素或生長因子之影響，而分化成為任何的間質組織 (也就是，支持性的身體組織，包括脂肪組織、骨組織、軟骨組織、彈性組織以及纖維結締組織)。骨髓係由高度組織化的造血、內皮及間質細胞所組成之複雜組織，也已被使用於治療骨骼或軟骨的缺陷或退化 (Vacanti CA, et al., Transac. Orthop. Res. Soc. 18(1):276, 1993; Caplan AI, et al., Clin. Orthop. 342:254-269, 1997)。由骨髓而得到的具有培養附著性 (culture-adherent) 之間質幹細胞，已被假設包含有骨前驅細胞、軟骨前驅細胞 (Weiss L, Anat. Rec. 186:161-184, 1976; Bianco P., Boyde A, Histochem. 100:93-99, 1993)、脂肪以及纖維芽細胞種系 (lineage) 之幹細胞 (Owen ME, Friedenstien AJ, Stromal stem cells. In: Evered D., Harnett S (eds.) Cell and molecular biology vertebrate hard tissue, Ciba Found. Symp. Vol. 136. Willey, UK, pp.42-60, 1988; Caplan AI, Clin. Plastic Surg. 21:429-435, 1993)。

具有複製更新 (renewal) 及多種系功能



五、發明說明 (3)

(multilineage potential)，可分化成脂肪、軟骨或骨骼種系之人類間質幹細胞，已從骨髓抽出物中分離出來 (Pittenger MF, et al., Science 284:143-147, 1999)。這是首次由骨髓衍生的幹細胞在活體外被成功地操作，並且代表組織工程新紀元之到來。由於缺乏對於免疫篩選之特定標幟以及發展分離方法所遇到的困難，由骨髓來源的間質幹細胞之應用因此受到限制。

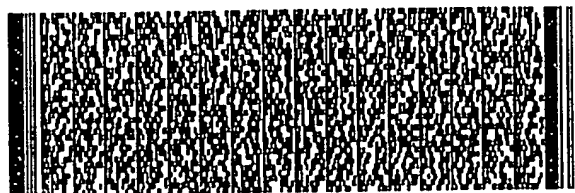
骨髓來源的間質幹細胞已藉由許多方法而分離。

Friedenstein AJ 等人 (Exp. Hematol. 4:276, 1976) 的方法是將整個骨髓樣品置於塑膠培養皿中，4 小時後，倒掉未附著的細胞；然而，由此分離的細胞是異質性的

(heterogeneous) 並且難以選殖。目前已有數種方法用以分離幹細胞，包括使用單株抗體，例如，STRO-1

(Oyajobi BO, et al., J. Bone Miner. Res. 14:351-361, 1999) 及抗-Sca-1 (van Vlasselaer P, et al., Blood 84:753-763, 1994)，以分離骨前驅細胞；以及使用抗-CD41 單株抗體 (Thiede MA, et al., 美國專利第 5,965,436 號) 之間接方法，以分離巨核球細胞以及與巨核球細胞相連的間質幹細胞。

上述這些免疫篩選的方法都需要數個步驟的反應才能完成，其方法主要包括：(1) 將細胞與專一性結合之抗體接觸；(2) 將與抗體結合的細胞及未結合的細胞分離，並移除未結合的抗體；以及 (3) 分離並篩選所需的細胞。特別地，由於抗體的吸附/交互作用，標的細胞的



五、發明說明 (4)

表面抗原以及相關的細胞活性可能因此受到影響甚至損壞，此外，使用專一性的單株或多株抗體，亦會使得分離的成本及時間增加。因此，對於發展一種簡易、安全、有效並經濟之分離骨髓及其他來源的間質幹細胞的方法，以大量用於相關疾病的治療，有其急迫的需要。

發明概述

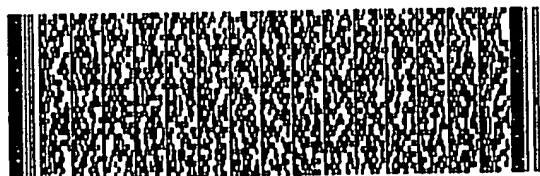
有鑑於此，本發明提供一種分離間質幹細胞之方法，包括：(a) 提供一包含間質幹細胞之細胞混合物；(b) 將該細胞混合物接種至一培養裝置上；以及(c) 回收並培養該間質幹細胞。較佳地，此培養裝置包括一具有孔洞（例如，孔徑大約0.4到16微米）之膜板，其中該孔洞足以分離間質幹細胞以及其他細胞。

本發明的第二形態是提供一種分離的間質幹細胞，係藉由上述方法而分離，此分離的間質幹細胞具有複製更新及多分化之功能。

本發明的第三形態是提供一種組成物，包括上述之分離的間質幹細胞以及一培養液，其中該培養液可使該間質幹細胞生長。

本發明更包括一種醫藥組合物，包括上述之分離的間質幹細胞以及一藥學上可接受之載體，其中，當組織因老化、外傷或疾病損壞時，該間質幹細胞可作為細胞置換及基因治療之用途。

為了讓本發明之上述和其他目的、特徵，及優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例並配合附件，做詳細說明



五、發明說明 (5)

如下：

附件之簡單說明

附件1(a)係顯示骨髓細胞第一次接種培養後7天之光學顯微鏡圖，顯示細胞具有纖維芽細胞之形態；附件1(b)係顯示骨髓細胞第一次接種培養後17天之光學顯微鏡圖，顯示細胞已長滿並具有均質性之形態。

附件2係顯示細胞均質性以及對CD表面抗原專一性之流體細胞測量分析。

附件3係顯示人類間質幹細胞培養物的骨質誘導。相對於3(a)之對照組，誘導組3(b)中顯示各種程度的陽性鹼性磷酸酶染色。

附件4係以von Kossa技術染色的細胞，顯示在誘導21天後，與基質有關的礦物質之存在。

附件5係顯示間質幹細胞培養物的脂肪組織分化。相對於5(a)之對照組，誘導組5(b)中顯示各種程度的陽性油-紅0 (Oil-red 0) 染色。

附件6係顯示間質幹細胞培養物的軟骨組織分化。在誘導21天後，分別顯示以(a). 番紅 (Safranin-0) 染劑；以及(b). 甲苯胺藍 (toluidine blue) 染劑所染色的軟骨形態。

附件7係以免疫組織化學染色的細胞，顯示在誘導21天後，第II型膠原蛋白在基質中的存在。

發明詳述

人類間質幹細胞可提供作為所有間質細胞種系的前驅



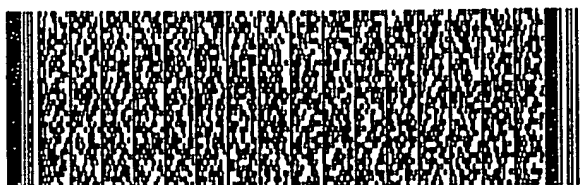
五、發明說明 (6)

細胞 (progenitor) , 包括, 但並不限於, 脂肪、軟骨、骨骼以及纖維結締組織。有一些骨髓來源的間質幹細胞之表面標幟, 可被一些單株抗體辨認, 例如, SH2、SH3及SH4 (參見美國專利第5,965,436號)。然而, 對於免疫篩選的方法, 仍是缺乏專一性的標幟以用於分離間質幹細胞。即使是以抗-CD41單株抗體結合巨核球細胞, 以間接分離間質幹細胞的方法, 其多項步驟所需之成本以及所分離的細胞之純度, 仍有改進的空間。

因此, 本發明提供一種新穎、簡易、有效且經濟之分離間質幹細胞的方法, 包括下列步驟: (a) 提供一包含間質幹細胞之細胞混合物; (b) 將該細胞混合物接種至一培養裝置上; 以及 (c) 回收並培養該間質幹細胞。

本發明之分離方法是根據細胞大小的不同、細胞附著能力的不同, 以及當與CD34⁺造血幹細胞共同培養時, 間質幹細胞僅是扮演支持角色等的特性, 而將間質幹細胞從細胞混合物中分離出來。由於間質幹細胞較其他的骨髓細胞大 (van Vlasselaer P, et al., supra)、易於附著於培養皿表面, 以及支持造血幹細胞的角色 (Huang S., et al., Nature 360:745, 1993) 之因素, 本發明可使用一種培養裝置而將間質幹細胞物理性地分離出來。

在一較佳具體實施例中, 上述用以分離細胞之培養裝置包括一具有孔洞之膜板, 其中孔洞的大小足以分離間質幹細胞以及其他細胞。更佳地, 此孔洞具有大約0.4到16微米 (μm) 範圍之直徑。



五、發明說明 (7)

根據本發明之分離方法，任何包含間質幹細胞之細胞混合物都可當作本發明之分離來源，包括哺乳動物（例如，人類）、動物或植物的細胞來源，其中，間質幹細胞的來源可包括，但並不限於，分離或未分離之組織、血液或體液來源。較佳地，上述間質幹細胞的來源可得自骨髓、胚胎卵黃囊、胎盤、臍帶、胎兒、青少年以及成年人之體液及組織中；其中，骨髓可得自腸骨脊（iliac crest）、股骨、脛骨、脊椎、肋骨或其他髓部的空間。

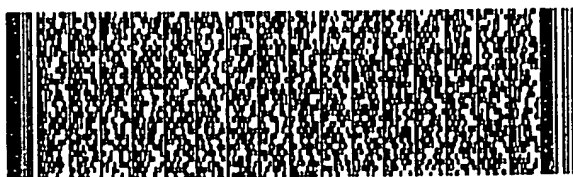
根據本發明之方法所分離出的間質幹細胞，具有反覆複製更新的能力，同時具有多分化的功能

（pluri-potential differentiation），可分化成為，例如，骨、脂肪或軟骨組織。較佳地，根據本發明之方法所分離出的間質幹細胞，是具有CD34表面抗原陰性

（CD34⁻）之特性，但其他種類表面抗原之間質幹細胞，也是在本發明的範疇之內。

根據本發明之分離方法，可用於培養間質幹細胞的培養液並無特別的限制，例如，含有1克/公升葡萄糖的DMEM培養液（DMEM-LG；Life Technologies），並補充以10%胎牛血清（fetal bovine serum）；其他可培養間質幹細胞的培養液以及相關的添加物，例如，防腐劑、pH指示劑等，也是在本發明的範疇之內。

將骨髓細胞接種至一嵌入式的培養皿的上層模板，其具有大約0.4到16微米範圍直徑之孔洞，較小體積的造血細胞在附著前，可通過孔洞而落至下層培養皿，此外，上



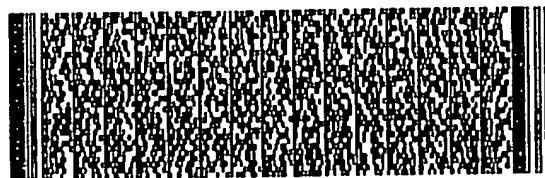
五、發明說明 (8)

層培養液中之非附著性的細胞，也可藉由置換培養液而移除，藉此，可回收兩種不同的細胞。前者是附著在下層的培養皿中，具有多角狀 (polygonal) 的外型，並且在繼代培養 (subculture) 之後，不具複製更新的能力；後者是附著在上層的培養皿中，具有纖維芽狀細胞

(fibroblastic-like) 之形態，以及具有複製更新的能力並可接受誘導分化成為間質組織多種系之能力。纖維芽狀細胞可藉由0.25%胰蛋白酶-EDTA回收，並再接再種至含有10%胎牛血清之DMEM-LG培養液中，而不會喪失吸附的能力。這些分離的間質幹細胞可在上述培養液中增殖而不分化，並在17天後長滿培養皿。

根據本發明的一種形態，分離間質幹細胞的方法包括將含有間質幹細胞的細胞混合物，與含有一比例（例如，10%）的胎牛血清之培養液混合；將細胞混合物接種至一培養裝置上；以及在含有10%胎牛血清之DMEM-LG培養液中，回收並培養該間質幹細胞。在含有可刺激間質幹細胞生長的因子的培養液中，分離的間質幹細胞可維持纖維芽狀細胞之形態而不會分化，並且可使得只有間質幹細胞選擇性地附著在基質表面上，以達到分離的效果。間質幹細胞的均質性，可藉由置換培養液以移除非附著性的細胞而達成。

在一較佳具體實施例中，根據本發明之方法，經過12代的繼代培養之後，增殖且未分化的細胞可長滿培養皿，並可得到超過98%均質性的人類間質幹細胞。在流體細胞



五、發明說明 (9)

測量 (flow cytometry) 分析中，這些細胞對於CD34、CD14、CD38、CD50、CD120a均顯示表面抗原陰性。回收的間質幹細胞可接受誘導分化成為骨骼、脂肪、軟骨及其他各種類型的結締組織。

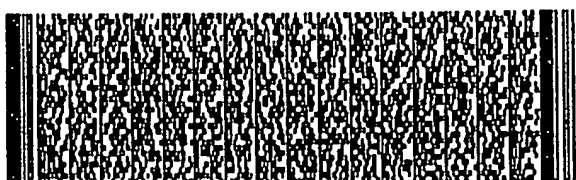
本發明也包括所分離的間質幹細胞之應用，特別地，是包括一藥學上可接受的載體所組成之醫藥組合物，當組織因老化、外傷或疾病損壞時，該間質幹細胞可作為細胞置換及基因治療之用途。例如，人類間質幹細胞可有效於：(1) 提供研究細胞分化及組織發育成特定間質種系之完整模式；(2) 發展間質細胞種系以及分析與其分化及發育有關的因子；(3) 偵測並評估調節間質幹細胞增殖並分化成特定間質種系之生長因子或抑制因子；(4) 在活體外擴展大量的均質/異質性細胞或組織，其可結合載體、支架或生物活性因子（例如細胞激素），或單獨地植回體內；(5) 大量生產用於移植的各種間質組織；(6) 使得因年齡、外傷、先天或後天疾病所造成損傷的間質組織再生；(7) 在活體內或活體外遺傳性地調節培養的間質幹細胞，以治療具有間質組織損傷之病患。

實施例

本發明將藉由以下的實施例而作更進一步地詳細說明，但這些實施例僅是作為舉例說明，而非用以限定本發明之範疇。

實施例1：骨髓細胞製備及細胞培養

從腸骨脊所得的骨髓抽出物，以3,000國際單位 (IU



五、發明說明 (10)

) 的肝素處理而抑制血球凝固。將處理過的骨髓與等量的磷酸鹽緩衝溶液 (PBS) 混合，並在室溫下，以 900 xg 離心 10 分鐘。將清洗的細胞再懸浮於 PBS 中，至最終體積為 5 毫升，並且覆於等體積之 1.073 克/毫升的 Percoll 溶液上，以 900 xg 離心 30 分鐘。收集在界面之單核細胞層。將溶於含有 10% 胎牛血清之 DMEM-LG (含 1 克/公升葡萄糖之 Dulbecco's 改質的 Eagle's 培養液; Life Technologies) 培養液中，以及抗生素 (青黴素 100 單位/毫升，鏈黴素 100 微克/毫升) 的 Percoll 分離或未分離之骨髓細胞，以 10^6 /平方公分的密度接種至培養裝置的上層。此培養裝置包括上下兩層，上層具有大約 0.4 到 16 微米範圍孔徑之膜板，下層為一塑膠培養皿。將細胞培養物維持在 37°C，5% CO₂ 中，第一次接種後 7 天更換培養液，以後每隔 4 天更換一次。

實施例 2：從骨髓細胞中分離並擴展間質細胞

勻稱的纖維芽細胞選植株可在大約接種後 7 天觀察到。藉由更換培養液而移除造血幹細胞及未附著的細胞。當細胞長滿時，以 0.25% 的胰蛋白酶-EDTA 將其回收，再以 $4 \times 10^3 \sim 10^4$ /平方公分的密度，接種至培養盤中擴展間質細胞。將所得到之擴展的細胞用於測試複製更新的能力，以及對於標幟蛋白質之特定反應。

實施例 3：流體細胞測量分析及定性

流體細胞測量分析是用於了解間質細胞的均質性並定性其表面抗原。將分離且擴展的間質細胞，藉由特定表面



五、發明說明 (11)

抗原之單株抗體而分析。將細胞回收於0.25%的胰蛋白酶-EDTA中，並以EDTA/PBS清洗兩次。將細胞暴露於80微升50x稀釋之FITC共軛結合的人類CD34單株抗體，接著置於80微升50x稀釋之PE共軛結合的人類CD單株抗體（CD14、CD29、CD38、CD50及CD120a中的一種）並含有1%牛血清白蛋白（BSA），在冰上放置45分鐘。然後將細胞混合物以EDTA/PBS清洗兩次，並固定於1%甲醛溶液中。使用525 nm波長的濾鏡以用於綠色FITC螢光，以及575 nm波長的濾鏡以用於紅色PE螢光，藉此分析細胞。

實施例4：多種系分化功能之誘導

將第一次接種培養後14天的骨髓間質細胞，培養在含有10%胎牛血清之DMEM-LG培養液中。經由下列條件誘導而分化：（1）骨骼分化培養液：50微克/毫升抗壞血酸-2-磷酸鹽（Sigma Co.）、 10^{-8} M之9- α -氟-16-甲基脫氫皮質醇（dexamethasone）（Sigma Co.）以及10 mM β -甘油磷酸酯（Sigma Co.）；（2）脂肪分化培養液：50微克/毫升抗壞血酸-2-磷酸鹽、 10^{-7} M之9- α -氟-16-甲基脫氫皮質醇以及50微克/毫升吲哚美辛（indomethacin）（Sigma Co.）；（3）軟骨分化培養：將細胞集團懸浮培養於含有10奈克/毫升轉形生長因子 β （TGF- β ）但不含血清之DMEM-LG培養液中。每隔4天更換一次培養液，並在分化完成後，將細胞以組織化學或免疫組織化學分析，以鑑定其形態學。

實施例5：組織化學染色及免疫組織化學分析

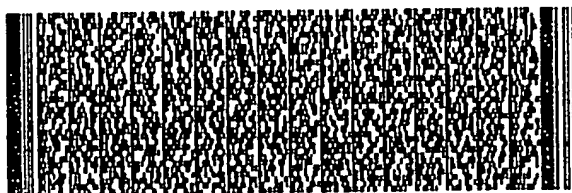


五、發明說明 (12)

移除培養液，並將細胞以PBS清洗兩次。將細胞在室溫下固定於3.7%對-甲醛10分鐘，並以PBS清洗兩次。分化為骨骼之細胞以鹼性磷酸酶染色及von Kossa染色；分化為脂肪及軟骨的細胞分別以油-紅O (Oil-red O) 及番紅 (Safranin-O) 或甲苯胺藍 (toluidine blue) 染色。同時也進行人類第II型膠原蛋白的免疫組織化學分析，以顯示骨髓間質幹細胞之軟骨組織分化。

根據本發明之方法，將經過Percoll分離或未分離之骨髓細胞接種至培養裝置的上層時，兩種不同類型的細胞可藉此分離出來。附著於下層培養皿的細胞，其特徵是體積較小、具有多角狀外型，幾乎不具複製更新能力；數日之後附著在上層培養皿的細胞，具有纖維芽狀細胞之形態，複製能力以及具有多種系分化之能力，並且證實為間質幹細胞。後者可維持形態上的均質性，並且比僅接種7天的培養皿，顯示具有明顯更多的數目（參見附件1(a)）。此外，可藉由更換培養液，移除造血幹細胞及未附著的細胞，以純化附著於上層的細胞。培養10天後可長滿（參見附件1(b)），並且以1分3的比例或 4×10^3 /平方公分的密度再接種，大約7天後可長滿。本發明所分離之間質幹細胞，即使繼代培養到第12代，仍可維持正常的增殖及未分化的狀態。

骨髓細胞之CD34⁺的部份一般被視為是造血幹細胞，但CD34⁺、CD38⁻、HLADR⁻、CD50⁻、Stro-1⁺部份曾有報告是基質前驅細胞的表面標幟 (Simmons PJ, Torke-Storb B,



五、發明說明 (13)

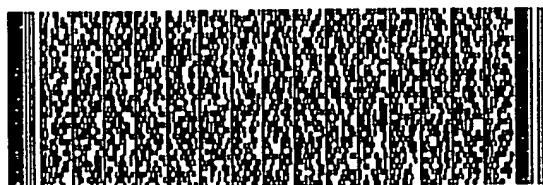
Blood 78:2848, 1991; Waller EK, et al., Blood, 85:2422, 1995)。Pittenger 等人 (supra) 曾指出，骨髓衍生的間質幹細胞，對CD44、CD71、CD90、CD106、CD120a及CD124為陽性，但對CD14、CD34及CD45是陰性。流體細胞測量分析顯示，本發明所分離之間質幹細胞，在接種後的14天仍是相當均質的細胞群。其表現型特徵顯示對CD14、CD34、CD38、CD50及CD120a的染色為陰性（然而，CD120a在Pittenger等人的報導中是顯示為陽性），但部份細胞對CD29具有弱的染色反應（附件2）。

以藥物誘導本發明所分離出的間質幹細胞，16天後可分化為骨細胞。相較於對照組，在抗壞血酸、9- α -氟-16-甲基脫氫皮質醇以及 β -甘油磷酸酯的影響下，分離的間質細胞形成陽性凝集的鹼性磷酸酶染色（附件3）或陽性的von Kossa染色結（附件4）。

以藥物誘導本發明所分離出的間質幹細胞，7天後可分化為脂肪細胞。相較於對照組，在抗壞血酸、9- α -氟-16-甲基脫氫皮質醇以及吲哚美辛的影響下，分離的間質細胞形成陽性的油-紅O凝集（附件5）。脂肪組織的誘導也可由富含脂質的液泡堆積在細胞內而證實。

軟骨組織在處理後21天發育完成。在組織切片（附件6）及免疫組織化學法（附件7）中顯示，細胞外的基質均富含軟骨狀的腔室及凝集素以及第II型膠原蛋白。

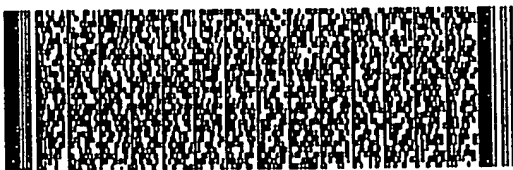
由以上的附件顯示，根據本發明之方法所分離之間質幹細胞，在適當的誘導條件下，可具有多分化的功能，顯



五、發明說明 (14)

示在不須使用任何抗體的情況下，亦可使用本發明所提供之簡便、安全、有效並經濟之分離方法，大量獲得高純度之間質幹細胞、以用於相關疾病的治療。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟悉此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍，當視後附之申請專利範圍而所界定者為準。



六、申請專利範圍

1. 一種分離間質幹細胞之方法，包括下列步驟：

- (a) 提供一包含間質幹細胞之細胞混合物；
- (b) 將該細胞混合物接種至一培養裝置上；以及
- (c) 回收並培養該間質幹細胞。

2. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該培養裝置包括一具有孔洞之膜板，其中該孔洞足以分離間質幹細胞以及其他細胞。

3. 如申請專利範圍第2項所述之方法，其中該孔洞具有大約0.4到16微米範圍之直徑。

4. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該包含間質幹細胞之細胞混合物包括哺乳動物、動物或植物的細胞來源。

5. 如申請專利範圍第4項所述之方法，其中該間質幹細胞之來源包括分離或未分離之組織、血液或體液。

6. 如申請專利範圍第5項所述之方法，其中該哺乳動物包括人類。

7. 如申請專利範圍第5項所述之方法，其中該間質幹細胞之來源係擇自骨髓、胚胎卵黃囊、胎盤、臍帶、胎兒、青少年以及成年人之體液及組織所組成的族群中。

8. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該間質幹細胞具有多分化功能。

9. 如申請專利範圍第8項所述之方法，其中該間質幹細胞可分化成為之組織包括骨、脂肪及軟骨組織。

10. 如申請專利範圍第8項所述之方法，其中該間質幹



六、申請專利範圍

細胞具有CD34表面抗原陰性之特性。

11. 如申請專利範圍第1項所述之方法，其中該間質幹細胞係培養在含有10%胎牛血清之DMEM-LG培養液。

12. 一種分離的間質幹細胞，係由申請專利範圍第1項所述之方法而分離，其具有多分化之功能。

13. 如申請專利範圍第12項所述之間質幹細胞，其可分化成為之組織包括骨、脂肪及軟骨組織。

14. 如申請專利範圍第12項所述之間質幹細胞，其具有CD34表面抗原陰性之特性。

15. 一種組成物，包括如申請專利範圍第12項所述之間質幹細胞以及一培養液，其中該培養液可使該間質幹細胞生長。

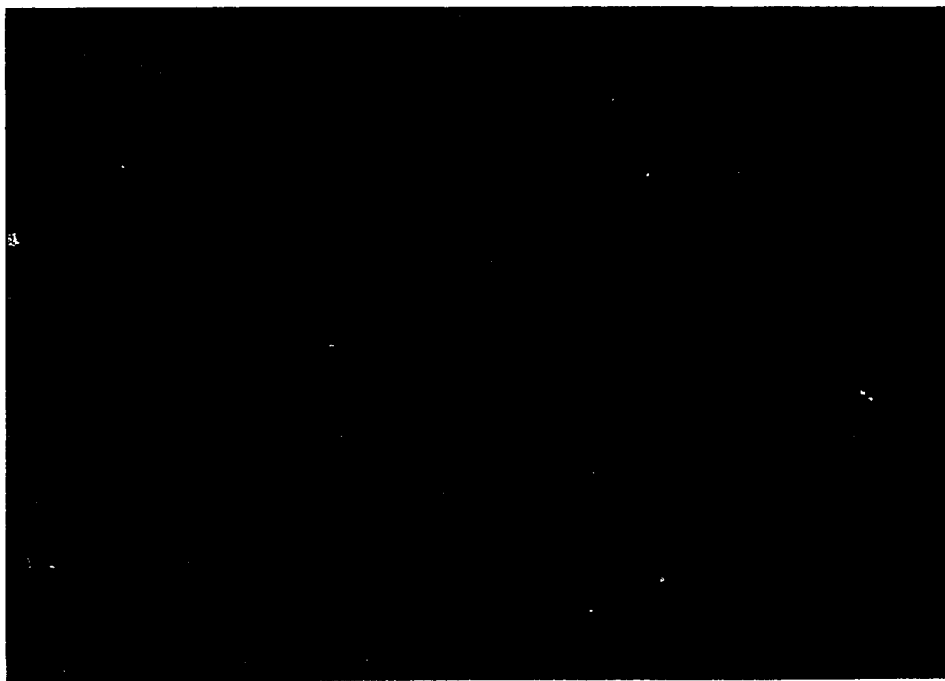
16. 如申請專利範圍第15項所述之組成物，其中該間質幹細胞具有CD34表面抗原陰性之特性。

17. 如申請專利範圍第15項所述之組成物，其中該培養液包括含有10%胎牛血清之DMEM-LG培養液。

18. 一種醫藥組合物，包括如申請專利範圍第12項所述之間質幹細胞以及一藥學上可接受之載體，其中，當組織因老化、外傷或疾病損壞時，該間質幹細胞可作為細胞置換及基因治療之用途。

19. 如申請專利範圍第18項所述之醫藥組合物，其中該間質幹細胞可分化成為之組織包括骨、脂肪及軟骨組織。

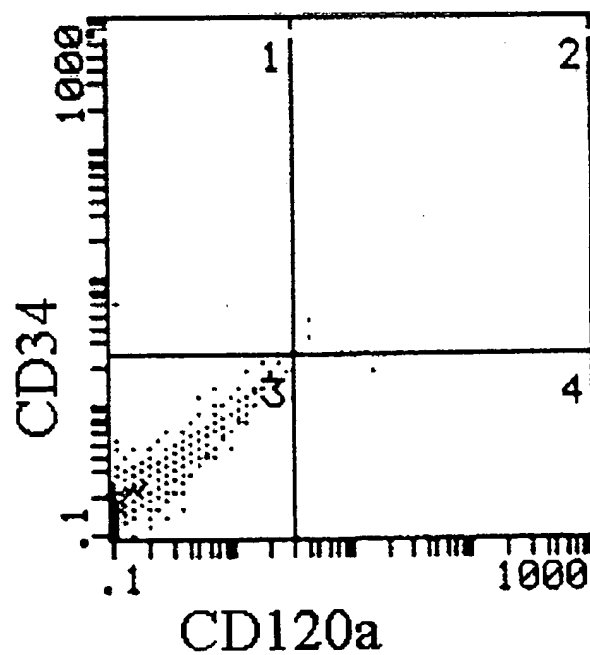
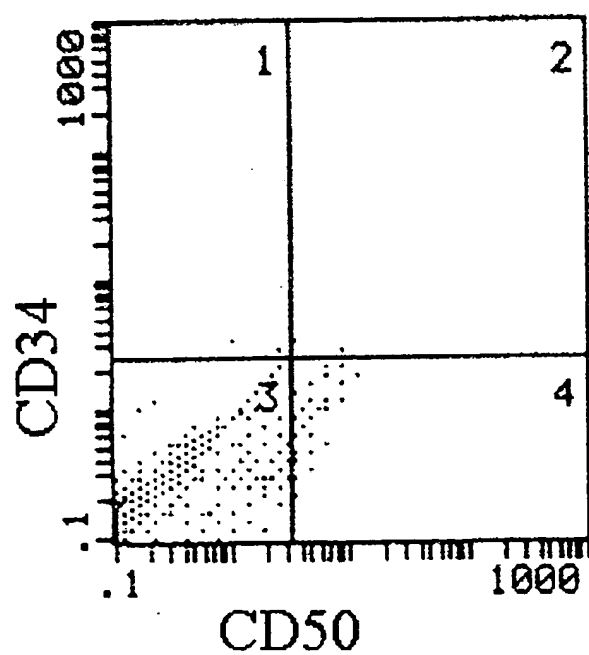
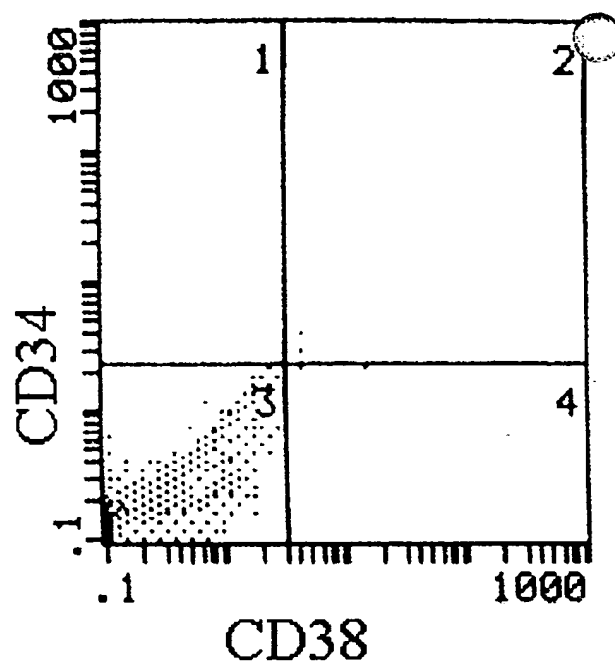
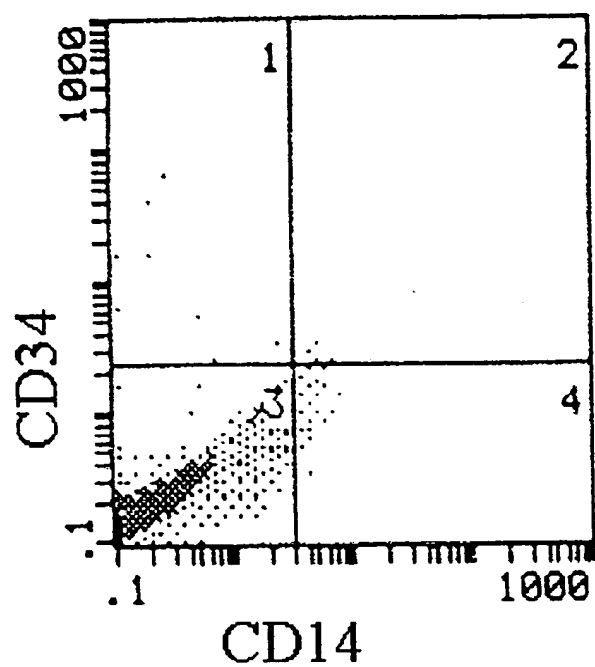


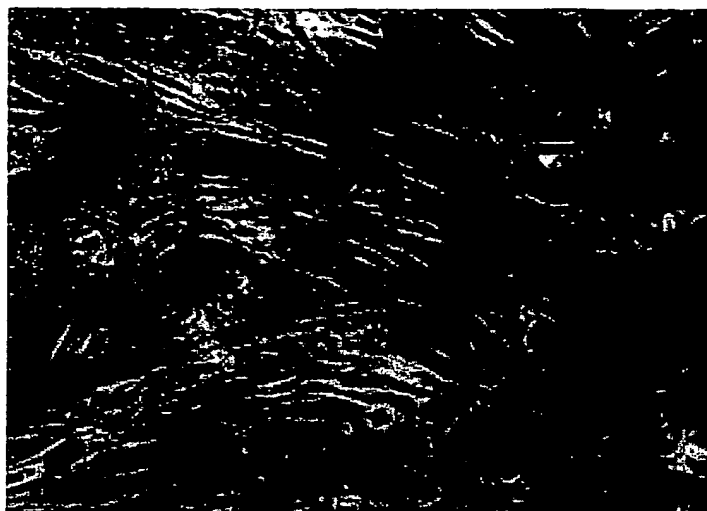


附件 1(a)



附件 1(b)

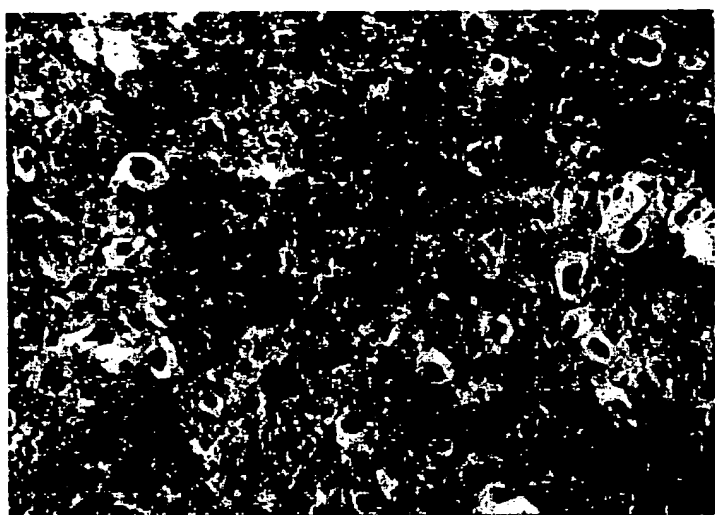




附件 3(a)



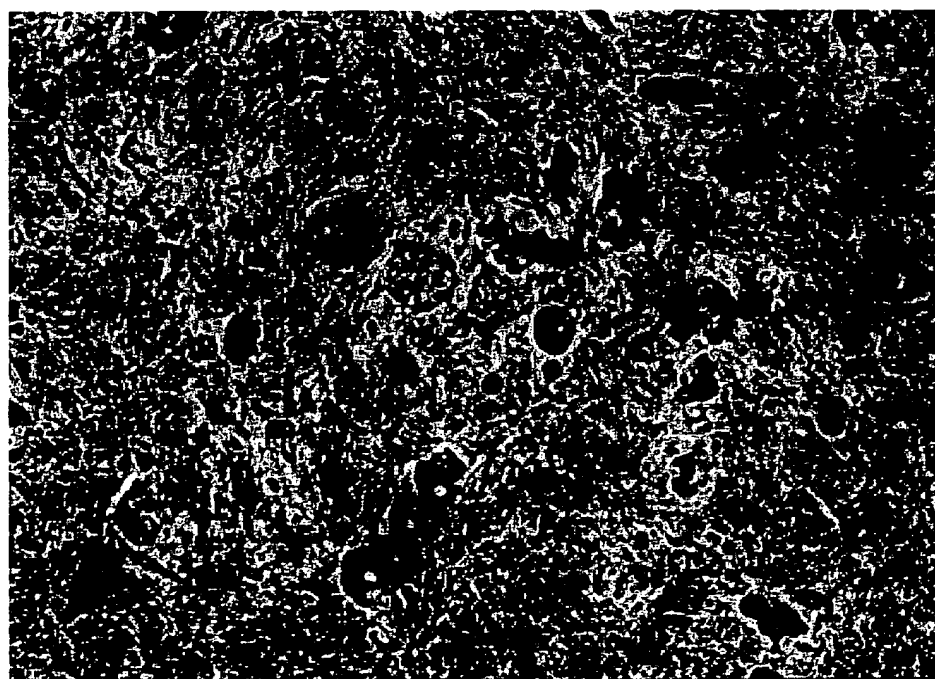
附件 3(b)



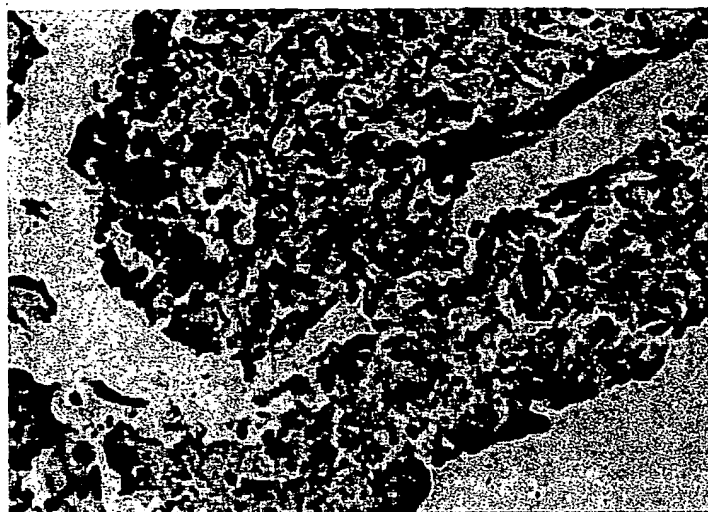
附件 4



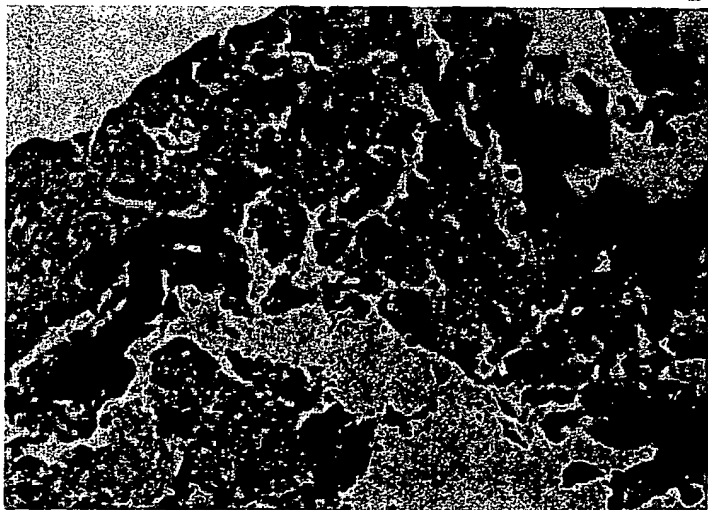
附件 5(a)



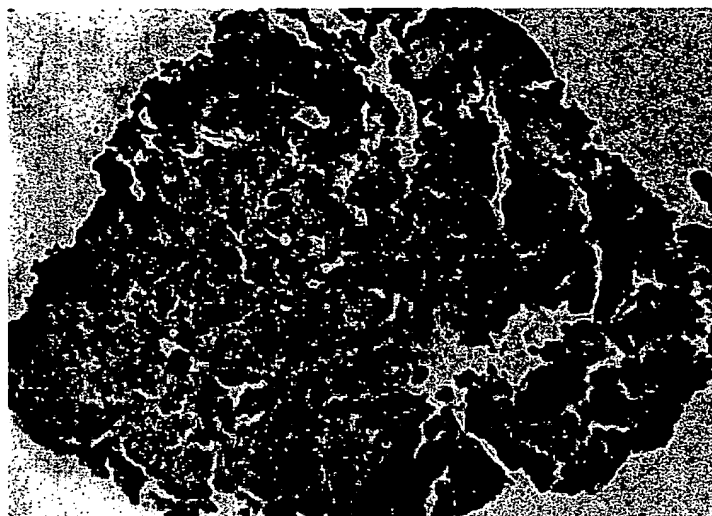
附件 5(b)



附件 6(a)

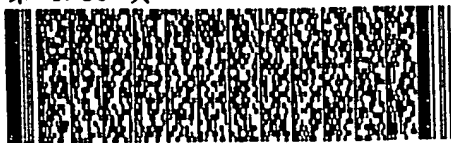


附件 6(b)

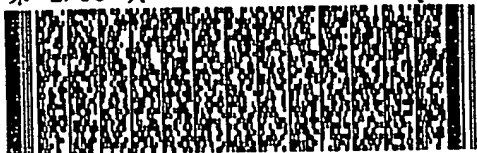


附件 7

第 1/19 頁



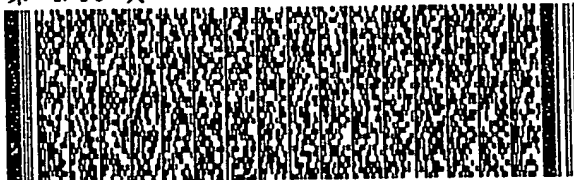
第 2/19 頁



第 4/19 頁



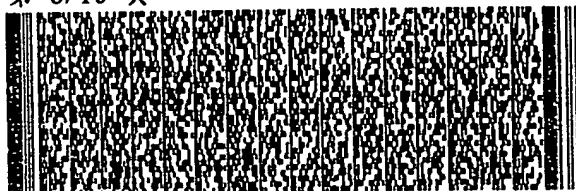
第 4/19 頁



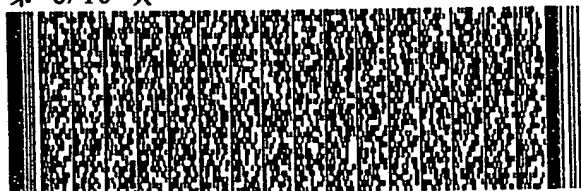
第 5/19 頁



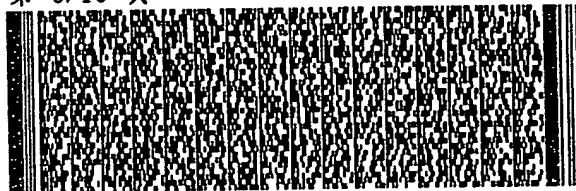
第 5/19 頁



第 6/19 頁



第 6/19 頁



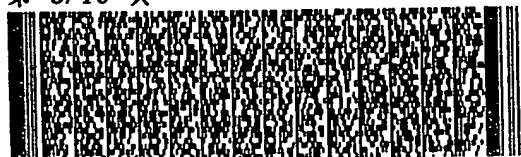
第 7/19 頁



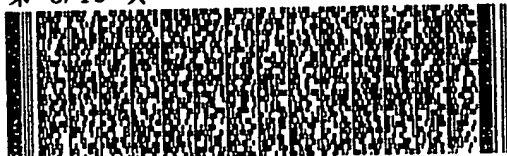
第 7/19 頁



第 8/19 頁



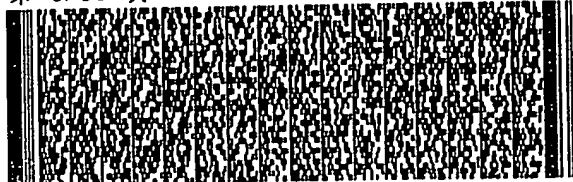
第 8/19 頁



第 9/19 頁



第 9/19 頁



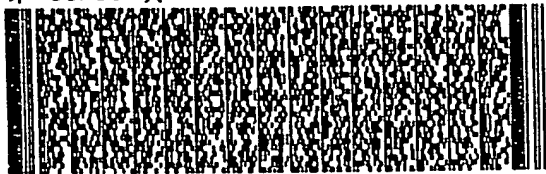
第 10/19 頁



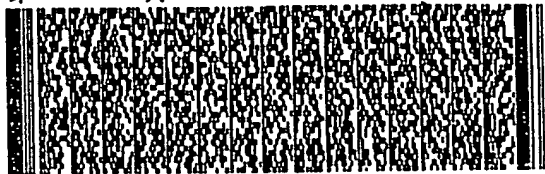
第 10/19 頁



第 11/19 頁



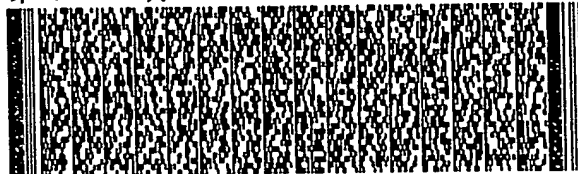
第 11/19 頁



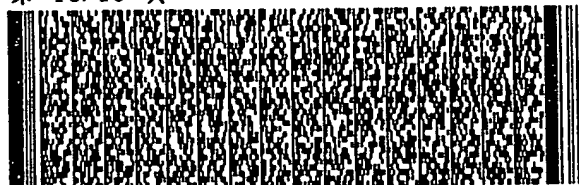
第 12/19 頁



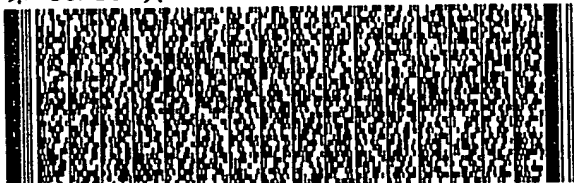
第 12/19 頁



第 13/19 頁



第 13/19 頁



第 14/19 頁



第 14/19 頁



第 15/19 頁



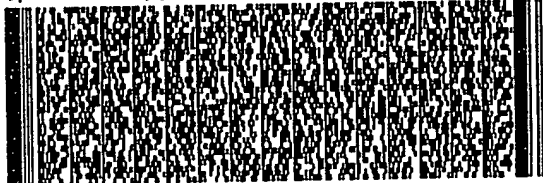
第 15/19 頁



第 16/19 頁



第 16/19 頁



第 17/19 頁



第 18/19 頁



第 18/19 頁



第 19/19 頁

